

F5

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58571</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 45%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03272</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 21 285.2 13. Mai 1998 (13.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): D1GALKE, Hans [DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE). FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Weimarer Strasse 6, D-10625 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p> </td> <td style="width: 55%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03272</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 21 285.2 13. Mai 1998 (13.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): D1GALKE, Hans [DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE). FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Weimarer Strasse 6, D-10625 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03272</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 21 285.2 13. Mai 1998 (13.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): D1GALKE, Hans [DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE). FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Weimarer Strasse 6, D-10625 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: HYBRID PROTEIN FOR INHIBITING THE DEGRANULATION OF MASTOCYTES AND THE USE THEREOF</p> <p>(54) Bezeichnung: HYBRIDPROTEIN ZUR HEMMUNG DER MASTZELLDEGRANULATION UND DESSEN VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a hybrid protein comprising or comprised of (i) a known protein which binds to mastocytes and/or basophils in a known manner and/or is absorbed thereby, and of (ii) a protease which splits one or more proteins of the secretory apparatus of the mastocytes and/or basophils.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus (i) einem an sich bekannten Protein, das in an sich bekannter Weise an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, und (ii) einer an sich bekannten Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Hybridprotein zur Hemmung der Mastzelldegranulation und dessen Verwendung

Hintergrund der Erfindung

Allergische Reaktionen vom Soforttyp sind dadurch gekennzeichnet, daß betroffene Patienten Antikörper vom IgE-Typ gegen Allergene (z.B. Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare) gebildet haben. Diese Antikörper zirkulieren nicht nur im Blut, sondern sind auch gebunden an gewebeständigen Zellen, die einen spezifischen Rezeptor für einen Teil des IgE-Moleküls, das Fc-Fragment, in der Plasmamembran besitzen (Fishman & Lorberboum-Galski, 1997; Hamawy, M.M. 1997). Zellen mit IgE-Rezeptoren sind ausschließlich Mastzellen und Basophile. Diese Zellen sind die Effektorzellen für die allergische Reaktion vom Soforttyp. Sie speichern Vesikel, welche vasoaktive Amine sowie Prostaglandine

und Leukotrine (Arachidonsäurederivate) enthalten. Die Freisetzung dieser Substanzen, die zur Degranulation der Mastzellen führt, erfolgt über einen spezifischen und einen unspezifischen Mechanismus. Werden Zellen mechanisch zerstört, z.B. durch einen Kratzer auf der Haut, wird Histamin unspezifisch freigesetzt. An der Wunde rötet sich die Haut. Es bilden sich Quaddeln (Ödeme) und die Haut juckt (triple response). Substanzen, die Histamin spezifisch freisetzen, sind in relativ geringen Konzentrationen wirksam und setzen folgende Kette von Ereignissen (Signalkaskade) in Gang: Aktivierung von Phospholipase C, - Bildung der second messenger 'Diacylglycerol' und 'IP3' - Mobilisierung von Kalzium aus zellulären Speichern - Fusion der Granula mit der Zellmembran - Exozytose der Granula ohne Zytolyse - Austausch von Natrium gegen das positiv geladene Histamin aus dem Komplex mit Heparin und einem basischen Protein - Freisetzung des Histamins aus der Granulamatrix. Kommt es zum Kontakt zwischen den Mastzellen eines Allergikers und einem Allergen, so binden die IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche dieses Allergens. Werden genügend viele Allergenmoleküle gebunden, kommt es zur Aggregation der Rezeptoren in der Plasmamembran. Die Aggregation ist der spezifische Reiz für die Auslösung oben beschriebener Signalkaskade im Zellinneren. Die freigesetzten Substanzen lösen die allergischen Symptome aus (Konjunktivitis, Rhinitis, Asthma, Larynxödem, Urtikaria, Blutdruckabfall bis zum ausgeprägten anaphylaktischen Schock). Peptide, die im Gift von Bienen enthalten sind, wie z.B. das mast cell degranulating peptide (MCD), bewirken ebenfalls eine Mastzelldegranulation. Auch einige Arzneimittel verursachen eine spezifische Histaminfreisetzung als unerwünschte Wirkung. Beim Menschen ist die Histaminfreisetzung für Muskelrelaxantien, Dextrane, Azetylsalizylsäure (Aspirin), Morphin, Antibiotika, Röntgenkontrastmittel, Fremdseren etc. beschrieben.

Gelingt es, die Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran zu hemmen, so unterbleibt die Ausschüttung der Amine und Arachi-

donsäurederivate. Es werden folglich keine allergischen Reaktionen ausgelöst. Am Sekretionsprozess bzw. der Freisetzung sind eine Reihe von Proteinen (Fusionsproteine) beteiligt, die an Membranen sekretorischer Vesikel und/oder an der Plasmamembran gebunden sein können. Sie können auch im Zytosol vorkommen. Zu diesen Proteinen gehören SNAP 25, Synaptobrevin (VAMP) und Syntaxin bzw. deren Isoformen. Diese Proteine bilden einen Komplex (Fusionskomplex), der die sekretorischen Vesikel an der Innenseite der Plasmamembran fixiert. Die Fixation geht der Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran voraus, die durch einen IgE-vermittelten Ca^{++} -Einstrom ausgelöst wird. Durch die Inaktivierung eines der Proteine, etwa durch proteolytische Spaltung, wird die Bildung des Komplexes verhindert.

Bei Nervenzellen sind die genannten Fusionsproteine bekanntlich die Zielmoleküle (Substrate) der leichten Ketten der Neurotoxine, die vom *Bazillus Clostridium botulinum* produziert werden (Ahnert-Hilger & Bigalke, 1995 und Bigalke, 1999 in press). Bekannt sind derzeit sieben verschiedene Typen von Botulinumtoxinen (A, B, C1, D, E, F und G). Das erwähnte Synaptobrevin ist außerdem Zielmolekül für TeNT (Link et al., 1993), das von *Clostridium tetani* produziert wird, sowie für eine Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* (Binscheck et al., 1995). Die Toxine, außer dem letztgenannten, bestehen aus mindestens zwei funktionellen Domänen. Der C-terminale Teil des Proteins (schwere Kette) ist verantwortlich für seine Bindung an die Nervenzelle, während der N-Terminus (leichte Kette) sich durch die oben beschriebene hochspezifische proteolytische Aktivität auszeichnet. Die Toxine binden über ihre schwere Kette an Nervenzellen und gelangen über eine rezeptorvermittelte Endozytose und nachfolgende Translokation ins Zytosol, wo sie eines oder mehrere der genannten Fusionsproteine spalten, die für den Fusionskomplex konstitutiv sind. Nach der Spaltung des jeweiligen Proteins ist die Sekretion von Azetylcholin bzw. anderer

Transmitter aus den Nervenzellen gehemmt (Binscheck und Wellhöner, 1997).

Die Hemmung der Transmitterausschüttung wird bereits therapeutisch genutzt zur Behandlung dystoner Bewegungsstörungen sowie zur Unterdrückung überschießender parasympathischer Aktivitäten (Benecke und Kessler, 1995). Für die Clostridien-Neurotoxine sind keine anderen biologischen Substrate außer den Fusionsproteinen bekannt. Die schweren Ketten haben eine hohe Affinität zu peripheren Nervenzellen, so daß die mit ihnen verbundenen leichten Ketten nur in diese Zellen gelangen und in ihnen wirksam werden - obwohl auch andere Zelltypen, in denen Sekretionsprozesse stattfinden, die oben erwähnten Substrate, jedoch keinen Mechanismus zur Aufnahme der Protease besitzen (Marxen et al., 1989), beispielsweise Mastzellen und Basophile.

Beschreibung der Erfindung

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus

- (i) einem an sich bekannten Protein, das in an sich bekannter Weise an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird,
- (ii) einer an sich bekannten Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus

- (i) einem Protein, das an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, wobei das Protein (i) aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

IgE;

IgE-Fragment, insbesondere IgE-Fc-Fragment;

Antikörper gegen IgE-Rezeptor von Mastzellen und/oder Basophilen;

Fragment des Antikörpers gegen IgE-Rezeptor von Mastzellen und/oder Basophilen, insbesondere Fab-Fragment;

Antikörper gegen mastzellspezifischen Kaliumkanal; und
inaktives, jedoch bindendes MCD-Peptid, und

- (ii) einer Protease, insbesondere einer an sich bekannten Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus

- (i) einem Protein, insbesondere einem an sich bekannten Protein, das an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, insbesondere in an sich bekannter Weise, und

- (ii) einer Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet, wobei die Protease (ii) aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

leichte Kette eines Clostridium botulinum-Toxins, insbesondere Typ A, B, C1, D, E, F oder G;

katalytisch aktives Fragment der leichten Kette eines Clostridium botulinum-Toxins, insbesondere Typ A, B, C1, D, E, F oder G;

leichte Kette von Tetanustoxin (TeNT);
katalytisch aktives Fragment der leichten Kette von Tetanustoxin;
IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*; und
katalytische Domäne der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*.

Das erfindungsgemäße Hybridprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß das Protein (i) aus der vorstehenden Protein-Gruppe und die Protease (ii) aus der vorstehenden Protease-Gruppe ausgewählt ist.

Das erfindungsgemäße Hybridprotein kann ferner dadurch gekennzeichnet sein, daß zusätzlich zur leichten Kette eines *Clostridium botulinum*-Toxins oder von Tetanustoxin auch der N-terminale Teil der schweren Kette des betreffenden Toxins (H_N -Fragment) oder ein Fragment davon ein Teil des Hybridproteins ist.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hybridproteins zur Hemmung von Mastzellgranulation.

Würde man Mastzellen abtöten, so bestünde die Gefahr, daß es zu einem allergischen Schock kommt, wenn die absterbenden Mastzellen die gespeicherten endogenen Amine freisetzen. Weiterhin stimuliert der Abfall der Mastzellzahl die Neusynthese dieser Zellen, die dann erneut für allergische Reaktionen zur Verfügung stehen. Das erfindungsgemäße Hybridprotein unterscheidet sich damit fundamental von dem bekannten IgE-Fc/*Pseudomonas*-Exotoxin-Konjugat, das durch seine ADP-Ribosylierungs-Aktivität die Proteinsynthese inhibiert und damit den Zelltod bewirkt (Fishman & Lorberboum-Galski, 1997). Demgegenüber dient das erfindungsgemäße Hybridprotein nicht zur Abtötung von Mastzellen. Die Zellen bleiben vielmehr nach der Einwirkung vital und haben nur die Fähigkeit eingebüßt, vasokonstriktive Amine freizusetzen.

Eine Stimulation der Neusynthese unterbleibt. Bei einem therapeutischen Einsatz werden mögliche toxische Nebenwirkungen vermieden, die bei einem Konjugat zu erwarten sind, das auf dem kompletten cytotoxischen Pseudomonas-Toxin oder einem vergleichbaren Cytotoxin basiert.

Gegenstand der Erfindung kann also ein Konjugat (Hybrid-Protein) sein, bestehend aus (i) einem Protein oder Peptid (Transportprotein/-peptid) mit einer hohen Affinität zu Mastzellen/Basophilen und (ii) einer spezifischen Protease, welches die Degranulation bzw. den Sekretionsmechanismus der Zellen blockiert. Das Konjugat dient zur Therapie/Prophylaxe von allergischen Reaktionen vom Soforttyp.

- (i) Als hochaffine, mastzellbindende Komponente des Konjugates werden insbesondere Immunglobulin vom Typ E (IgE) bzw. dessen Fragmente (z.B. das Fc-Fragment) verwendet. Des weiteren werden auch Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle von Mastzellen/Basophilen eingesetzt, welche selektiv an deren Plasmamembran binden. Vor allem Antikörper gegen den IgE-Rezeptor erfüllen diesen Zweck. Weiterhin sollen inaktive, aber bindende Mutanten des mast cell-degranulating peptide als Transportpeptid im Hybrid-Protein verwendet werden. Diese Transportpeptide/-proteine dienen dazu, eine Protease in die Zellen zu schleusen. Diese Protease spaltet im Fusionskomplex der Mastzellen hochspezifisch Proteine, die den Degranulationsmechanismus der Zellen einleiten.
- (ii) Als hochspezifische Protease dient eine Metalloproteinasen, z.B. die leichte Kette von Botulinumtoxin Typ A, B, C1, D, E, F oder G (BoNT/X) sowie von Tetanustoxin (TeNT) oder die IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae*. Diese Proteasen spalten das synaptosomal-associated protein (MR 25.000) (SNAP 25), Synaptobrevin oder Syntaxin. Ist nur eines der

genannten Proteine/Peptide gespalten, ist die Degranulierung der Mastzellen gehemmt. Dann wird keine Sekretion von Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen mehr stattfinden, und allergische Symptome können nicht mehr auftreten.

In der vorliegenden Erfindung können die ungiftigen leichten Ketten der Toxine mit Transportproteinen verknüpft werden, die ausschließlich an Mastzellen bzw. Basophilen binden und daher nur von diesen aufgenommen werden, wobei die leichten Ketten - sozusagen als Trittbrettfahrer - zugleich in solche Zellen gelangen. In Nervenzellen oder andere Zelltypen des Organismus können sie nicht eindringen, so daß die Wirkung auf Mastzellen und Basophile beschränkt bleibt. Wenn eines der Substrate proteolytisch zerstört ist, treten nach dem Kontakt dieser IgE beladener Zellen mit einem Allergen oder einem der oben erwähnten Arzneimittel keine allergischen Symptome auf.

Als mastzellspezifisch bindende Proteine werden

- 1) Immunglobuline vom Typ E, deren Fragmente vom Typ Fc,
- 2) Antikörper gegen den IgE Rezeptor,
- 3) das mast cell-degranulating peptide und
- 4) ein Antikörper gegen den mastzellspezifischen Kaliumkanal verwendet.

Zu den aufgeführten Proteinen kann auf folgenden Stand der Technik verwiesen werden:

- IgE Helman (1995)
- IgE-Fc-Fragment Helman (1995)
- Antikörper gegen IgE-Rezeptor von Mastzellen/Basophilen, Antikörper gegen mastzellspezifischen Kaliumkanal, Fab-Fragment des Antikörpers: es handelt sich dabei um Standardverfahren, die beschrieben sind in:
Liddel & Weeks (1995)

- MCD Peptid

Gmachel & Krell (1995)

- Inaktive aber bindende Mutante

Das mutierte Peptid wird nach Standardverfahren hergestellt:

Nichol D.S.T. (1995)

- Leichte Ketten der verschiedenen Botulinumtoxine Typ A - G:

Binz et al. (1990)

- Leichte Kette von Tetanustoxin

Eisel et al. (1989)

- IgA-Protease

Bruscheck et al. (1995)

Die Verknüpfung beider Komponenten (Transportprotein und Protease) erfolgt auf verschiedenem Wege:

Zunächst wird die leichte Kette des Toxins chromatographisch gereinigt. Die leichte Kette ist völlig untoxisch, weil sie nach Trennung von der schweren Kette, dem neurotrophen Transportprotein, nicht in Nervenzellen gelangen kann und ein extrazelluläres Substrat nicht vorkommt. Die leichte Kette wird sodann chemisch mit einem der vier mastzellbindenden Proteine zu einem Konjugat verknüpft, welches in das Zytosol von Mastzellen aufgenommen wird. Dort spaltet die leichte Kette ihr Substrat, worauf die Sekretion von Histamin und anderer Substanzen blockiert ist. Ein zweiter Syntheseweg des Konjugats besteht darin, das Gen für die leichte Kette mit dem Gen für eines der vier mastzellbindenden Proteine zu fusionieren, so daß in geeigneten Wirtszellen ein Hybridprotein exprimiert wird. Dieses biotechnologisch produzierte Hybridprotein sollte analog zum aus zwei Proteinkompo-

nenten hergestellten Konjugat den Sekretionsprozess aus Mastzellen blockieren.

Die Herstellung von Hybridproteinen an sich ist ein bekanntes Verfahren insbesondere im Bereich der Tumorthherapie (Vogel, C.-W. 1987; Magerstadt, M., 1991). In diesem therapeutischen Konzept wird ein Antikörper gegen Oberflächenproteine der Tumorzellen mit einem cytotoxischen Protein, z.B. Ricin, Diphtherietoxin, verknüpft, um Krebszellen abzutöten. Neu an dem hier vorgestellten erfindungsgemäßen Verfahren ist der Einsatz von spezifischen Proteasen bzw. proteolytischen Domänen in Hybridproteinen zur Inhibition der Mastzelldegranulation und damit zur antiallergischen Therapie. Mit diesen Hybridproteinen ließen sich nicht nur stark beeinträchtigende allergische Symptome (Heuschnupfen, Asthma und Neurodermitis) verhindern. Sie könnten auch prophylaktisch zur Vermeidung allergischer Reaktionen im Rahmen von Therapien mit lebensrettenden Arzneimitteln verabreicht werden. Darüber hinaus könnten sie allergische Symptome verhindern, die bei Desensibilisierungen auftreten.

Beispiel 1: Synthese eines Hybridproteins aus IgE und der leichten Kette von BoNT/ A

Das gereinigte Botulinumtoxin (5.0mg) vom Typ A wurde nach Äquilibrierung in 15 mM Natriumtetraborat und 30 mM Phosphat, pH=8.4, auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte QAE-Sephadex-Säule (1.0x3.0 cm) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 10 mL 120 mM Dithioerythrol, 2 M Harnstoff und 1 mM EDTA gewaschen und über Nacht inkubiert. Danach wurde die leichte Kette mit 10 mM Boratpuffer von der Säule eluiert und gegen 20 mM Phosphat, pH=7.0, dialysiert.

Immunoglobulin E (Ratte) wurde käuflich erworben. 10 mg des Immunglobulins wurden mit 50µg Papain in 1 mL Phosphatpuffer gespalten (4°C über Nacht). Das F_c-Fragment wurde über ein Gelfiltrationssäule Sephacryl S200) gereinigt. 3.0 mg des gereinigten F_c-Fragments wurden mit 3.0 mg gereinigter leichter Kette von Botulinumtoxin mit dem 10mM bifunktionellen Agens Dithiobis-succinimidylpropionat in 2 mL Na-Phosphat, pH=7.0, 16 Stunden inkubiert. Das so synthetisierte Hybridprotein wurde durch Gelfiltration (Sephacryl S200) gereinigt und in der SDS-Gelelektrophorese auf Reinheit analysiert.

Die Hemmung der Degranulation der Mastzellen wird in zwei Versuchsansätzen überprüft. Im ersten Ansatz werden isolierte Mastzellen aus der Ratte mit dem Hybridmolekül inkubiert, und anschließend wird die Histaminfreisetzung stimuliert. Die Stimulation erfolgt mit spezifischen Histaminliberatoren, wie dem MCD-Peptid und dem Concanavalin A (letzteres ist eine experimentell genutzte Substanz), bzw. durch direkte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Letzteres erreicht man durch eine Injektion von Kalzium in einzelne Mastzellen. Damit schließt man die oben beschriebene Signalkaskade kurz, denn die Erhöhung der Kalziumkonzentration ist der Schritt im Sekretionsprozeß, dem die Vesikelfusion folgt. Die Degranulation der Mastzelle, die die Histaminfreisetzung widerspiegelt, wird im Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Im weiteren kann freigesetztes Histamin mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Schließlich kann die Vergrößerung der Mastzelle, die durch Einlagerung von Vesikelmembranen in die Plasmamembran bei der Degranulation verursacht wird, elektrophysiologisch bestimmt werden. In den mit Hybridprotein behandelten Zellen wird im Gegensatz zu Kontrollzellen 1. keine morphologische Änderung auftreten, 2. keine Verstärkung der Fluoreszenz im Zellüberstand stattfinden und 3. keine Vergrößerung der Zelle erfolgen. Damit kann nachgewiesen werden, daß die Freisetzung von Histamin durch das Hybridprotein blockiert ist.

In dem zweiten Ansatz wird das Hybridprotein lebenden Ratten injiziert. Die Ratten werden nach mehreren Tagen getötet und ihre Mastzellen mit konventionellen Methoden gewonnen. Die Degranulation, bzw. Freisetzung von Histamin wird wie oben beschrieben bestimmt. In diesem Ansatz wird geprüft, ob das Konjugat auch im lebenden Tier in das Kompartiment gelangen kann, in dem sich die Mastzellen befinden, und ob es sie dort inaktiviert.

Beispiel 2: Herstellung eines rekombinanten Hybridproteins durch Verknüpfung des Gens für die leichte Kette von Clostridium botulinum Typ A mit dem Gen für Immunglobulin E bzw. eines seiner Fragmente (Fc-Fragment.)

Das Gen für die leichte Kette von Botulinumtoxin A wird mittels geeigneter Primer über die PCR (polymerase chain reaction) isoliert. Dazu wird eine Kultur von Clostridium botulinum Typ A angelegt, aus der die DNA präpariert wird. Aus der publizierten Sequenz des Toxingens (Binz et al.) wird ein Primerpaar abgeleitet und mittels PCR das Gen für die leichte Untereinheit amplifiziert. Anschließend wird dieses Gen in einen kommerziellen Expressionsvektor pQE nach Angaben des Herstellers kloniert.

Das Gen für das F_c-Fragment des humanen Immunglobulins E (Helman L.), wurde mittels PCR aus einer kommerziellen cDNA-Bank isoliert und im Vektorkonstrukt mit dem Gen für die leichte Kette von Botulinumtoxin A fusioniert.

Mit diesem Konstrukt werden kompetente M15-Zellen (E.coli) transformiert. Da in diesem Expressionssystem die insertierten Gene mit einem „his-tag“ versehen sind, wird das rekombinate Protein über eine Ni-Affinitätssäule gereinigt. Der Hochreinigung schließt sich eine Gelfiltration über Sephacryl S300 an.

Die Testung der biologischen Aktivität erfolgte wiederum an isolierten Mastzellen in vitro.

Beispiel 3: Herstellung eines rekombinanten Hybridproteins durch Verknüpfung des Gens für die leichte Untereinheit von Tetanustoxin mit einem mutierten Gen für das Mast Cell Degranulating Peptide (MCD)

Die „Sequenz für das „Mast Cell Degranulating Peptide“, ein 22mer, ist bekannt (Gmachl, M, und Kreil, G.) Darauf basierend wird ein korrespondierendes Oligonukleotid synthetisiert.

Zur Isolierung der Sequenz der leichten Untereinheit von Tetanustoxin wurde Kultur von *C. tetani* angelegt und daraus DNA gewonnen. Aus der bekannten Nukleinsäuresequenz von Tetanustoxin wurde ein Primer für die PCR und damit das Gen für die leichte Untereinheit des Toxins gewonnen.

Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden beide Nukleinsäuresequenzen in einem Expressionsvektor pQU fusioniert und dann in *E. coli* exprimiert. Das Hybridprotein, das wiederum mit einem histag versehen war, wurde durch Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltration gereinigt. Gereinigtes Gen für das Mast Cell Degranulating Peptide wird chemisch synthetisiert mit einer Punktmutation in der aktiven Domäne des Peptids. Das Gen wird verknüpft mit dem Gen für die leichte Kette von Tetanustoxin. Das Hybridprotein wird in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Das so hergestellte Hybridprotein wird in vitro im Mastzell-Degranulations-Assay geprüft.

Beispiel 4: Herstellung eines rekombinanten Hybridproteins durch Verknüpfung des Gens für das F_c -Fragment von IgE mit dem Gen für die IgA-Protease

Das Gen für das F_c -Fragment von IgE wurde, wie im Beispiel 1 beschrieben, isoliert.

Das Gen für die IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* ist bekannt. Daraus wurden Primer abgeleitet, und aus einer Nukleinsäurepräparation von *N. gonorrhoeae* wurde mittels PCR das Gen für die spezifische Protease gewonnen.

Beide Nukleinsäuren wurden in einen kommerziellen Vektor nach den Angaben des Herstellers integriert und das Hybridprotein durch Affinitätschromatographie (s. Beispiel 2) gereinigt.

Die inhibitorische Aktivität wird wiederum in vitro an isolierten Mastzellen nachgewiesen (s.o.)

Beispiel 5: Herstellung eines Hybridproteins, das aus dem Fab-Fragment eines Antikörper gegen den IgE-Rezeptor und der leichten Kette von Botulinumtoxin Typ B besteht

Ein monoklonaler Antikörper gegen den IgE-Rezeptor auf Mastzellen wurde käuflich erworben und chromatographisch nachgereinigt. 0.5 mg des Antikörpers wurden mit 0.4 g der gereinigten leichten Kette von Botulinumtoxin F konjugiert. Die leichte Untereinheit wurde nach der Präparation des Neurotoxins nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben durch Spaltung des Neurotoxins und anschließender Reinigung über eine Ionenaustauscherchromatographie isoliert.

Die beiden Proteine (leichte Untereinheit von Toxin Typ F und monoklonaler Antikörper) wurden mit einem bifunktionellen Rea-

gens mit einander verknüpft. Dazu wurden die isolierten Proteine mit 10 mM Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester inkubiert. Das Hybridprotein wurde anschließend durch Gelfiltration über Sephacryl S300 von nichtkonjugierten Proteinen gereinigt.

An isolierten Mastzellen wird wiederum gezeigt, daß das synthetisierte Hybridprotein die Histaminsekretion hemmt.

Bezug zu anderen Patenten:
Patent No. 4902495
IgE Fc directed delivery systems

Novel Agent Controlling Cell Activity
PCT Anmeldung WO 94/21300

Literatur:

- 1) Ahnert-Hilger G., Bigalke H. (1995)
Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning.
Progress in Neurobiology 46: 83-96
- 2) Benecke R., Kessler K.R. (1995)
Botulinumtoxin A
Akt. Neurol. 22: 209-213
- 3) Bigalke, H. (1999 in press)
Clostridial Toxins, Handbook of Experimental Pharmacology and Toxicology, Ed. Just & Aktories, Springer Verlag.
- 4) Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S., Hayashi T., Niemann H., Polner J. (1995)
IgA protease from Neisseria gonorrhoeae inhibits exocytosis in bovine chromaffin cells like tetanus toxin.
J. biol. Chem. 270: 1770-1774
- 5) Binscheck T., Wellhöner H.H. (1997)
Tetanus and botulinum toxins - zinc proteases - synaptotagmin - exocytosis.
In: Toxins and signal transduction
(Eds.: Gutman Y., Lazarovici P.) 1: 457-487
- 6) Binz, T. , Kurazono, H., M., Frevert, J. , Wernars, K. & Niemann, H. (1990)
The complete sequence of botulinum toxin A and comparison with other clostridial neurotoxins

J.Biol.Chem. 265: 9153-9158

7) Cardoso, F. & Jancovic, J. (1995)
Clinical use of botulinum neurotoxins
Current Topics Microbiol.Imunol. 195: 123-141

8) Fishman, A., Lorberboum-Galski, H. (1997)
Targeted elimination of cells expressing the high-affinity
receptor for IgE (Fc epsilon RI) by a Pseudomonas exotoxin-based
chimeric protein
Eur.J.Immunol., 27:486-494

9) Gmachl, M. & Kreil, G. (1995)
The precursors of the bee venom constituents apamin and MCE
peptide are encoded by two genes in tandem which share the same
3'-exon
J.Biol.Chem. 270 (21): 12704-12708

10) Helman, L. (1995)
Characterization of four novel epsilon chain mRNA and a
comparative analysis of genes for immunoglobulin E in rodents
and man
Eur. J. Immunol. 23 (1):, 159-167

11) Liddel & Weeks (1995)
Antikörper-Techniken
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

12) Link E., Edelmann I., Chou J., Binz T., Yamasaki S., Eisel
U., Baumert M.,
Südhof T.C., Niemann H. & Jahn R. (1992)
Tetanus toxin action: Inhibition of neurotransmitter release
linked to synaptobrevin proteolysis.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 189: 18423-26

13) Magerstadt, M. (1991)
Antibody conjugates and malignant diseases
CRC Press

14) Hamawy, M.M. (Ed.) 1997)
IgE Receptor (FcεRI) Function
In: Mast Cells and Basophils
Springer Verlag

15) Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. (1989)
Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum
A neurotoxins on exocytosis in chromaffin
cells.
Toxicon 27: 849-859

16) Nichol D.S.T. (1995)
Gentechnische Methoden
Spektrum Akademischer Verlag

17) Vogel, C.-W. (Ed.) (1987)
Immunoconjugates: Antibody conjugates in radio-immaging anth
therapy of cancer
Oxford UP Inc.

Patentansprüche

1. Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus
 - (i) einem an sich bekannten Protein, das in an sich bekannter Weise an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, und
 - (ii) einer an sich bekannten Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.
2. Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus
 - (i) einem Protein, das an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, wobei das Protein (i) aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

- IgE,
IgE-Fragment, insbesondere IgE-Fc-Fragment,
Antikörper gegen IgE-Rezeptor von Mastzellen und/oder
Basophilen,
Fragment des Antikörpers gegen IgE-Rezeptor von
Mastzellen und/oder Basophilen, insbesondere Fab-Frag-
ment,
Antikörper gegen mastzellspezifischen Kaliumkanal und
inaktives, jedoch bindendes MCD-Peptid, und
- (ii) einer Protease, insbesondere einer an sich bekannten
Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretions-
apparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.
3. Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus
- (i) einem Protein, insbesondere einem an sich bekannten
Protein, das an Mastzellen und/oder Basophile bindet
und/oder von ihnen aufgenommen wird, insbesondere in an
sich bekannter Weise, und
- (ii) einer Protease, die ein oder mehrere Proteine des Se-
kretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen
spaltet, wobei die Protease (ii) aus der folgenden Gruppe
ausgewählt ist:

leichte Kette eines Clostridium botulinum-Toxins, ins-
besondere Typ A, B, C1, D, E, F oder G;

katalytisch aktives Fragment der leichten Kette eines
Clostridium botulinum-Toxins, insbesondere Typ A, B,
C1, D, E, F oder G;

leichte Kette von Tetanustoxin (TeNT);

katalytisch aktives Fragment der leichten Kette von
Tetanustoxin;

IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*; und
katalytische Domäne der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*.

4. Hybridprotein nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein (i) aus der Gruppe gemäß Anspruch 2 und die Protease (ii) aus der Gruppe gemäß Anspruch 3 ausgewählt ist.
5. Hybridprotein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zur leichten Kette eines *Clostridium botulinum*-Toxins oder von Tetanustoxin auch der N-terminale Teil der schweren Kette des betreffenden Toxins (H_N -Fragment) oder ein Fragment davon ein Teil des Hybridproteins ist.
6. Verwendung eines Hybridproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Hemmung von Mastzelldegranulation.



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 19/00, A61K 38/16		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58571
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03272		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 198 21 285.2 13. Mai 1998 (13.05.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTEC-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIGALKE, Hans [DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE). FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Weimarer Strasse 6, D-10625 Berlin (DE).			
(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 3. Februar 2000 (03.02.00)	
(54) Title: HYBRID PROTEIN FOR INHIBITING THE DEGRANULATION OF MASTOCYTES AND THE USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: HYBRIDPROTEIN ZUR HEMMUNG DER MASTZELLDEGRANULATION UND DESSEN VERWENDUNG			
(57) Abstract <p>The invention relates to a hybrid protein comprising or comprised of (i) a known protein which binds to mastocytes and/or basophils in a known manner and/or is absorbed thereby, and of (ii) a protease which splits one or more proteins of the secretory apparatus of the mastocytes and/or basophils.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Hybridprotein, umfassend oder bestehend aus (i) einem an sich bekannten Protein, das in an sich bekannter Weise an Mastzellen und/oder Basophile bindet und/oder von ihnen aufgenommen wird, und (ii) einer an sich bekannten Protease, die ein oder mehrere Proteine des Sekretionsapparates der Mastzellen und/oder Basophilen spaltet.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/03272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K19/00 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUSTGARTEN, JOSEPH ET AL: "Prolonged inhibition of IgE production in mice following treatment with a IgE-specific immunotoxin" MOL. IMMUNOL. (1996), 33(3), 245-251 , XP002124080 page 245 -page 246	1-6
A	SLATER, JAY E. ET AL: "IgE immunotoxins. Effect of an IgE -ricin A chain conjugate on rat skin histamine content" J. IMMUNOL. (1988), 140(3), 807-11 , XP002124081 page 807 page 810 -page 811, left-hand column --- -/--	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 1999

Date of mailing of the international search report

10. 12. 99

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mennessier, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/03272

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WD 97 22364 A (YISSUM RES DEV CO ; FISHMAN ALA (IL); YARKONI SHAI (IL); LORBERBOUM) 26 June 1997 (1997-06-26) page 8 -page 19 -----</p>	1-6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03272

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim 6 relates to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the hybrid protein.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Information on patent family members

PCT/EP 99/03272

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03272

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K19/00 A61K38/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LUSTGARTEN, JOSEPH ET AL: "Prolonged inhibition of IgE production in mice following treatment with a IgE-specific immunotoxin" MOL. IMMUNOL. (1996), 33(3), 245-251 , XP002124080 Seite 245 -Seite 246	1-6
A	SLATER, JAY E. ET AL: "IgE immunotoxins. Effect of an IgE -ricin A chain conjugate on rat skin histamine content" J. IMMUNOL. (1988), 140(3), 807-11 , XP002124081 Seite 807 Seite 810 -Seite 811, linke Spalte	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. 12. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mennessier, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03272

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

A

WO 97 22364 A (YISSUM RES DEV CO ;FISHMAN
ALA (IL); YARKONI SHAI (IL); LORBERBOUM)
26. Juni 1997 (1997-06-26)
Seite 8 -Seite 19

1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03272

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 6 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen des Hybridproteins.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03272

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9722364 A	26-06-1997	AU 1070797 A	14-07-1997
		CN 1207686 A	10-02-1999
		EP 0868198 A	07-10-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.